ул. Школьная д.19, кв 2, тел 53-06-27. ***С.Ю. Стебловская*** - г. Курск, ул. Понизовка д.52 кв 44, тел 8-950-870-30-34.

УДК: 534.7.576.341.19.21.09

О.А.Лопатина, Р.Я. Подчерняева, В.В. Егоров, Е.И. Исаева, О.В. Бакланова, М.Н. Щетвин

(НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина)

ВЛИЯНИЕ СЛАБЫХ АКУСТИЧЕСКИХ КОЛЕБАНИЙ НА КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Ключевые слова: клетки человека и животных, влияние звука на пролиферацию, цитокины, вирус.

Проблема влияния акустических колебаний особенно низкой частоты и интенсивности на организм в условиях физического загрязнения окружающей среды становится все более актуальной. В частности, механические колебания и звук различной силы постоянно сопровождают человека в быту и на производстве. Их последствия во многом негативны и часто не предсказуемы [1].

Систематическое исследование биологического действия низкочастотных акустических колебаний началось сравнительно недавно - в 70-е годы прошлого столетия. В основном оно касалось действия инфразвука на организм, в том числе человека. Было установлено, что такой звук высокой интенсивности (до 200 дБ) вызывает неприятные субъективные реакции: чувство беспокойства и страха, головокружение и головную боль, давление на барабанные перепонки, тошноту вплоть до болей в желудке и пр. [1, 2]. В лабораторных опытах на животных было показано, что инфразвук может оказывать влияние на гипоталамо-гипофизо-нейросекреторные системы, на динамику обмена белка в стенках желудка, а также молочной кислоты и креатинфосфата в крови [3-5].

Акустические колебания оказывают воздействие на растения и семена, что отражается на их ростовых параметрах [6]. Причем, мишенями могут служить клетки (в том числе бактериальные и дрожжевые), их мембраны и мембраноподобные структуры, а также ферменты в их составе [6, 7]. Однако работы, посвященные биологическому действию на клетки слышимого звука не многочисленны. В этой связи целью настоящей работы было изучение влияния акустических колебаний низкой интенсивности в широком диапазоне частот на различные клеточные линии человека и животных.

Материалы и методы

Из коллекции клеточных культур НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН были отобраны клеточные линии нормальных и опухолевых клеток человека и животных. Клеточные линии культивировали в питательных средах: перевиваемые диплоидные клетки легкого эмбриона человека (ЛЭЧ) на смеси сред Игла МЕМ с добавлением 199 среды (1:1), клетки печени человека (Chang liver), клетки конъюнктивы глаза человека (Chang conjunctiva) - на среде Игла, клетки костного мозга больного лейкемией (L41) - на среде Игла МЕМ, для опухолевых клеток гепатомы человека (СН5) использовали среду ДМЕМ. Перевиваемые линии клеток животных: почек собаки (MDCK) культивировали в среде Игла, почек свиньи (СПЭВ) - в 199 среде.

К каждой клеточной линии добавляли 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) фирмы НПО «ПанЭко». Пробирки с клетками подвергали воздействию звука 40 Дб следующих частот: 50 Гц, 100 Гц, 200 Гц, 500 Гц, 1000 Гц, 2000 Гц, 5000 Гц, 10000 Гц, 20000 Гц - в течение 10 мин на расстоянии 40 см с помощью звукового динамика, соединенного с генератором акустических частот ГНЧ-1. Далее клетки культивировали в термостате при 37^0 С с 5% CO_2 по общепринятой методике в течение 72 часов. Посевная доза клеток составила $2x10^5$ кл/мл. Для снятия клеток со стекла приме-

няли смесь версена с химопсином производства ООО «Самсон -Мед»(на 0,5 л – 50 мг). После образования монослоя определяли индекс пролиферации (ИП), т.е. соотношение числа выросших клеток к числу посеянных.

Влияние звука на репродукцию вирусов гриппа А (H3N2 и H1N1) изучали на клетках MDCK. Были взяты штаммы вирусов гриппа А/Аичи/1/68(H3N2), А/Брисбен/10/07 (H3N2), А/Соломоновы острова/03/06 (H1N1).

В работе использовали однодневный монослой культуры клеток MDCK, полученный в 96-луночных пластиковых панелях фирмы «Costar». После удаления питательной среды и промывки монослоя раствором Хенкса проводили заражение культур клеток 10-кратным разведением вирусов гриппа (с 10^{-1} по 10^{-8}) в объеме по 20 мкл на лунку. Через 30 мин монослой клеток отмывали и добавляли по 100 мкл соответствующей питательной среды без ЭТС. Клетки инкубировали при температуре 37 ^{0}С в течение 48 ч., после чего в культуральной жидкости определяли инфекционный титр вируса методом Рида и Менча (в lg $ТЦД_{50}$) и титр гемаглютининов (ГА) в реакции геммаглютинации с эритроцитами человека группы крови 0(I).

Определение mРНК цитокинов проводили на культуре клеток MDCK, обработанных соответствующими частотами. Активность mРНК 11 цитокинов определяли методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Выделение РНК проводили по методу [8]. Обратная транскрипция и ПЦР-амплификация были выполнены в соответствии с методикой [11]. В работе использована пара праймеров для следующих цитокинов: ИФНα, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ФНОα, ИФНγ, ИЛ-18, ИЛ-12 [9-13].

В качестве положительного контроля использовали праймеры для β-актина[10].

Пробы к ДНК использовали в качестве отрицательного контроля. Регистрация результатов ПЦР осуществляли электрофоретически в 2,5% агарозном геле, окрашенным бромистым этидием. Для идентификации нуклеотидных последовательностей использовали маркер для электрофореза фирмы Promega (G1758).

Результаты исследований

В первой серии экспериментов исследовалась пролиферативная активность (ИП) клеток после воздействия на них различных акустических частот (от 50 до 20000 Гц)..

Звук влияет на пролиферацию клеточных линии, повышая или снижая их активность роста в зависимости от частоты. При этом можно выделить общие для всех клеточных линий определенные тенденции. Так, при частотах 50 и 1000 Гц отмечено нарастание индекса пролиферации (ИП) или совпадение его с показателями контроля. В тоже время снижение ИП для всех видов исследуемых линий наблюдается при воздействии звука частотой 100 и 500 Гц.

Совпадение экстремумов на определенных частотах, возможно, объясняется резонансным откликом, который хорошо прослеживается в диапазонах от 50 до 1000 Гц и вероятно, имеет универсальную природу. При частотах свыше 1000 Гц пролиферативная активность каждой клеточной линии имеет свои особенности.

Таким образом, сходная ответная реакция большинства клеточных линий в определенном диапазоне акустических частот свидетельствует об общности механизмов их влияния на пролиферативную активность. Проведенные ранее исследования по изучению активности клеточных ферментов при воздействии низких частот показали аналогичные изменения в тех же диапазонах (6). В частности сравнение полученных данных для клеточных линий ЛЭЧ, MDCK, L41 и Chang liver выявило корреляцию с частотным спектром ферментативной активности трипсина (максимальная активность которого отмечена при 50 и 1000 Гц, а минимальная при 100 Гц, 500 и 10000 Гц). Таким образом, нельзя исключить, что одной из мишеней действия акустических частот на клетки могут являться протеолитические ферменты.

Нами было исследовано влияние низкого уровня звукового диапазона на цитокиновую активность клеточной линии MDCK(табл. 2). Показано подавление выработки интерферонов (ИФНα и γ) при воздействия звука в диапазоне от 50 до 10000 Гц по сравнению с контролем. Одновременно наблюдалось нарастание продукции провоспалительных интерлейкинов ИЛ1 ИЛ2, ИЛ4, ИЛ8, ИЛ10, ИЛ18 и ФНОα при частотах 2000 и 10000 Гц. Отметим, что интерлейкины ИЛ 12 и ФНОα в пробах отсутствовали, а ИЛ6 обнаружен только после воздействия звуком частотой 10000 Гц. Таким образом, звук низкой частоты приводит к подавлению выработки интерферонов в клеточных культурах и усилению выработки ряда провоспалительных интерлейкинов. Полученные дан-

Таблица 1

Влияние акустических частот на экспрессию mРНК цитокинов в клетках MDCK.

Частоты (Гц)	ИФНα	ИФНγ	ИЛ1β	ИЛ2	ИЛ4	ИЛ6	ИЛ8	Ил10	ИЛ12	ИЛ18	ФНОα
контроль	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
50	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
500	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
2000	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
10000	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-

Обозначения: (+)- наличие активности mРНК; (-)- отсутствие активности mРНК

ные могут быть результатом стрессового действия звука на клеточную линию, возможно связанного с избирательностью его воздействия на определенные ферменты.

Во второй серии экспериментов была изучена гемагглютинирующая активность и репродукция вирусов гриппа А под влиянием звука. В табл. 2 представлены титры гемагглютининов (НА) и инфекционный титр гриппа (lg ТЦД$_{50}$) для двух штаммов вируса H3N2 и одного штамма H1N1 после воздействии различных акустических частот. Как видно из таблицы, титры НА у штамма А/Аичи/1/68 (H3N2) понижаются в 2 раза (до титра 1/160) при воздействии частотой 20 000 Гц в течение 30 мин, а у штамма А/Брисбен/10/07 H3N2 понижение титра НА наблюдается в 8 раз (до титра 1/20) при воздействии звуком с частотой 5000 Гц. У штамма А/Соломоновы острова 03/06 (H1N1) титр НА понижен только в 2 раза, начиная с воздействия частотой от

Таблица 2

Титры НА и ТЦД 50 вирусов гриппа А в клетках MDCK при воздействии различными акустическими частотами

Вирус	Штамм	Частота (Гц)	Время воздействия/мин	Титр НА	ТЦД$_{50}$ (lg)
H3N2	А/Аичи 1/68 (НА-1/320, ТЦД$_{50}$-6,0)	2000	30	320	6,0
			60	320	6.0
		5000	30	320	6,0
			60	320	6,0
		10000	30	320	6,0
			60	320	6,0
		20000	30	160	5,5
			60	160	5,0
H3N2	А/Брисбен 10/07 (НА-1/160, ТЦД$_{50}$ - 3,0)	2000	30	80	3,0
			60	80	3,0
		5000	30	80	3,0
			60	20	3,0
		10000	30	40	3,0
			60	20	3,0
		20000	30	20	2,5
			60	20	2,0
H1N1	А/Соломо- новы острова 03/06 (НА 1/640, ТЦД$_{50}$-4,0)	2000	30	320	4,5
			60	640	4,0
		5000	30	640	4,5
			60	320	4,0
		10000	30	320	4,5
			60	320	4,0
		20000	30	320	4,0
			60	320	3,5

5 000 до 20000 Гц.

Т.е. наблюдается разная чувствительность гемагглютининов у разных штаммов вируса гриппа А при воздействии различных акустических частот.

Таким образом, обнаружено, что для проявления выраженного эффекта в случае меньшей звуковой частоты требуется большее время воздействия, что, очевидно, связано с энергией звуковой волны (чем ниже частота, тем меньше энергия). При этом играет роль и время воздействия: чем длительнее больше время воздействия, тем активнее идет подавление репродукции вирусов гриппа при той же акустической частоте. Т.е. выявлена дозовая зависимость чувствительности вируса к действию звука (в определенных пределах). Так, инфекционный титр вирусов понижается у всех штаммов на 0,5 $lgТЦД_{50}$ при воздействии частотой 20000 Гц в течение 30 мин и на 1,0 $lgТЦД_{50}$ при воздействии в течение 1 часа.

Полученные в работе результаты представляют определенный интерес в понимании влияния на метаболизм клетки слабых акустических частот.

SUMMARY

Influence of weak acoustic oscillations was studied on different human and animal cell lines which were shown to change the proliferations activity. Expression of genes IFN-α and IFN-γ in MDCK cells was inhibited under action of oscillations from 50 to 10000Hz. It was founded that hemagglutinaton titer and reproduction of influenza A (H1N1 and H3N2) viruses were decreased under impact of oscillations with frequency 20000 Hz for 60 minutes.

Литература

1. Радиационная медицина Т.4, изд. «Аврора»,-1999,-С.256-276.
2. Готовский Ю.В., Петров Ю.Ф. «Особенности биологического действия физических и химических факторов малых и сверхмалых интенсивностей и доз», изд. «Имедис»-2003, С.117-125.
3. Кесаманлы Н.В. «Изменение содержания креатинфосфата и молочной кислоты при вибрации»//Цитология 1968, Т.10, №7, С.905-906.
4. Яглов В.В., Далин Ю.М., Евстафьева Н.Я. «Влияние низкочастотных акустических колебаний на морфо-функциональное состояние эндокринной системы».// Гигиена труда и проф. заболеваний , 1987, №5, С.47-50.
5. Якубович Т.Г. ., Гецель Х.А. «Авторадиографические исследования влияния общей вибрации на проницаемость гистогематических барьеров и обмен белков в желудочной стенке. Структура и функция гистогематических барьеров». Москва, Наука, 1971, С. 98-101.
6. Егоров В.В. Низкие частоты в биологии. М.-ФГОУ ВПО – МГАВМиБ им. Скрябина. 2007, С.55.
7. Андриянов Ю.В., Андриянова О.И., Голованов М.В. с соавторами. «Влияние импульсных электрических полей и акустических ударных волн на культивируемые клетки». Ж.Цитология, №3/4, 1999, С.257-258.
8. Chomezynski P., N.Sacchi. // Anal. Biochem., 1987, 162, p.156-159.
9. Gaede K.I., U.Mamal, M.Schlaak et al. //. Mol. Med., 1999,77(12), p.847-852.
10. Gelder CM., P.S. Thomas, D.H. Yates, I.M. Adcock, J.F.J. Morrison el al. //Thorax, 1995, 50,p.l033-1037.
11. Lin Y., M.Zhang, P.F.Barnes. // Infection and Immunity, 1998, 66(3), p. 121-126
12. Thomas S. Harrison, S.M.Levitz. // Infection and Immunity, 1996, No. 3, p.4492-4497. S.Trincbieri G., D.Peritt, F.Gerosa. // Cytokine and growth factor reviews, 1996, v.7, No.2, p.123-132.
13. Yamamura M., K.Uyemura, R.J.Deans, K.Weinberg, T.H.Rea et al. // Science, 1991, 254(11), p.277-279.

Контактная информации об авторах для переписки

Лопатина Ольга Алексеевна - 123098, Москва Гамалеи, 16, раб. тел.: (499) 190-28-50, моб.: (906) 731-30-07.

УДК: 619:612.32:636.32/.38

О.С. Бушукина, В.В. Валькова

(ГОУВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Аграрный институт (г. Саранск))

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СТАРЕНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ СТЕНКИ ЖЕЛУДКА ОВЕЦ

Ключевые слова: ЦНС – центральная нервная система; ВНС – вегетативная нервная система.

Введение

Изменения, происходящие в нервной ткани в процессе естественного старения животного привлекают большое внимание исследователей, в том числе и патонейроморфологов, поскольку по своим внешним признакам их наиболее трудно дифференцировать с морфологией нерв-